

SÉRIE A, N° 408
N° D'ORDRE : 432

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Chaouki ADRA

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE SÉROLOGIQUE ET CHIMIQUE DE CERTAINS
COMPOSÉS ARSENICAUX ENVISAGÉS COMME ANTI-
GÈNES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

4 AVR 1940

Soutenues le 1940 devant la Commission d'examen.

MM. ROBERT LEVY. *Président.*

R. WURMSER. . }
E. AUBEL. . . . } *Examineurs.*

PARIS
LIBRAIRIE E. LE FRANÇOIS
91, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 91

1940

SÉRIE A, N° 408
N° D'ORDRE : 432

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Chaouki ADRA

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE SÉROLOGIQUE ET CHIMIQUE DE CERTAINS
COMPOSÉS ARSENICAUX ENVISAGÉS COMME ANTI-
GÈNES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1940 devant la Commission d'examen.



MM. ROBERT LEVY. *Président.*
R. WURMSER. . }
E. AUBEL. . . . } *Examineurs.*

PARIS
LIBRAIRIE E. LE FRANÇOIS
91, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 91

—
1940

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraire</i> ...	H. LEBESGUE.	LESPIEAU.	H. ABRAHAM.
	Émile PICARD.	MARCHIS.	Charles FABRY.
	Léon BRILLOUIN.	VESSIOT.	Léon BERTRAND,
	PÉCHARD.	PORTIER.	WINTREBERT.
	FREUNDLER.	MOLLIARD.	DUBOSCQ.
	AUGER.	LAPIQUE.	BOHN.
	DANGEARD.	G. BERTRAND	RABAUD.

PROFESSEURS

M. CAULLERY.....	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	FOCH.....	T	Mécanique expérimentale des fluides.
Émile BOREL.....	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	PAUTHENIER.....		Physique (P. C. B.)
Jean PERRIN.....	T	Chimie physique.	De BROGLIE.....	T	Théories physiques.
E. CARTAN.....	T	Géométrie supérieure.	CHRÉTIEN.....		Optique appliquée.
A. COTTON.....	T	Recherches physiques.	P. JOB.....		Chimie générale.
J. DRACH.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LABROUSTE.....		Physique du Globe.
Charles PÉREZ.....	T	Zoologie.	PRENANT.....	T	Anatomie et histologie comparées.
M. GUICHARD.....	T	Analyses et mesures chimiques.	VILLEY.....		Mécanique physique et expérimentale.
Paul MONTEL.....	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	COMBES.....	T	Physiologie végétale.
L. BLARINGHEM...	T	Botanique.	GARNIER.....	T	Mathématiques génér.
G. JULIA.....	T	Mécanique analytique et mécan. céleste.	PÉRÈS.....		Mécanique théorique des fluides.
C. MAUGUIN.....	T	Minéralogie	HACKSPILL.....		Chimie (P. C. B.).
A. MICHEL-LÉVY...	T	Pétrographie.	LAUGIER.....	T	Physiologie générale.
A. DENJOY.....	T	Application de l'analyse à la géométrie.	TOUSSAINT.....		Technique Aéronaut.
L. LUTAUD.....	T	Géographie physique et géologie dynamique.	M. CURIE.....		Physique (P. C. B.).
Eugène BLOCH.....	T	Physique.	G. RIBAUD.....	T	Hautes températures.
G. BRUHAT.....	T	Physique théorique et physique céleste.	CHAZY.....	T	Mécanique rationnelle.
E. DARMOIS.....	T	Enseignement de Physique.	GAULT.....		Chimie (P. C. B.).
A. DEBIERNE.....	T	Physique générale et radioactivité.	CROZE.....		Recherches physiques
A. DUFOUR.....	T	Physique (P. C. B.).	DUPONT.....	T	Théories chimiques.
L. DUNOYER.....		Optique appliquée.	LANQUINE.....	T	Géologie structurale et géologie appliquée.
A. GUILLIERMOND..	T	Botanique.	VALIRON.....		Mathématiques génér.
M. JAVILIER.....		Chimie biologique.	BARRABÉ.....		Géologie structurale et géologie appliquée.
L. JOLEAUD.....	T	Paléontologie.	MILLOT.....		Biologie animale (P. C. B.).
ROBERT-LÉVY.....	T	Physiologie comparée.	F. PERRIN.....		Théories physiques.
Henri VILLAT.....	T	Mécanique des fluides et applications.	VAVON.....		Chimie organique.
Ch. JACOB.....	T	Géologie.	G. DARMOIS.....		Calcul des Probabilités et Physique Mathématique.
P. PASCAL.....	T	Chimie générale.	CHATTON.....	T	Biologie maritime.
M. FRÉCHET.....	T	Calcul différentiel et calcul intégral.	AUBEL.....		Chimie biologique.
E. ESCLANGON.....	T	Astronomie.	Jacques BOURCART.		Géographie physique et Géologie dynamique.
M ^{me} RAMART-LUCAS	T	Chimie organique.	M ^{me} JOLIOT-CURIE..		Physique générale et Radioactivité.
H. BÉGHIN.....	T	Mécanique physique et expérimentale.	PLANTEFOL.....		Biologie végétale (P. C. B.).
			CABANNES.....		Enseignement de Physique.
			GRASSÉ.....		Biologie animale (P. C. B.).
			PRÉVOST.....		Chimie (P. C. B.).
			BOULIGAND.....		Mathématiques.
			CHAUDRON.....		Chimie (P. C. B.).

Secrétaire A. PACAUD.
Secrétaire honoraire D. TOMBECK.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

En témoignage de ma profonde affection.

A MA SŒUR ET MES FRÈRES

Avec mes plus vifs sentiments de reconnaissance.

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MONSIEUR le PROFESSEUR ROBERT LÉVY

Professeur de Biologie à l'École Normale

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. AUBEL

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. WURMSER

Directeur de Laboratoire de Biophysique
de l'École des Hautes-Études

Qui nous ont fait l'honneur d'accepter de faire partie du Jury de cette thèse.

Témoignage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS MARTIN .

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur
Grand Officier de la Légion d'Honneur

A MONSIEUR G. RAMON

Membre de l'Académie de Médecine
Sous-Directeur de l'Institut Pasteur
Commandeur de la Légion d'Honneur

À MONSIEUR R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE

Docteur ès Sciences
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Officier de la Légion d'Honneur

*Qui a bien voulu nous ac-
cueillir dans son Service.*

*En témoignage de vive gra-
titude et de sincère attache-
ment pour sa constante bien-
veillance à notre égard.*

A MON MAITRE
MONSIEUR LE DOCTEUR N. KOSSOVITCH

de l'Institut Pasteur
Ancien Professeur à l'École d'Anthropologie de Paris

*Qui nous a inspiré le sujet
de ce travail et nous en a
permis la réalisation.*

*En témoignage de vive re-
connaissance pour ses en-
couragements et sa cons-
tante bienveillance à notre
égard.*

A MONSIEUR ET MADAME J. TRÉFOUEL

Chefs de Travaux du Laboratoire de Chimie Thérapeutique
de l'Institut Pasteur

*Que nous remercions très
sincèrement pour l'aide pré-
cieuse et amicale qu'ils nous
ont apportée au cours de nos
recherches.*

INTRODUCTION

E. METCHNIKOFF avait créé la théorie cellulaire de l'immunité en faisant de celle-ci un phénomène de digestion. La célèbre expérience que firent RICHET et HÉRICOURT en 1888 sur le pouvoir protecteur du sérum de chiens immunisés contre le staphylocoque pyogène, devait attirer l'attention sur l'immunité humorale. En 1890, BEHRING et KITASATO, ROUX et ses collaborateurs démontrent que les sérums des animaux immunisés contre certaines toxines, jouissent d'une action préventive antitoxique et curative sur ces poisons. Enfin en 1898, J. BORDET, poursuivant ses recherches magistrales sur les anticorps et leurs réactions vis-à-vis des antigènes, découvrira les sérums hémolytiques. La réaction de fixation du complément, — qu'EHRLICH s'essaye d'expliquer chimiquement, — devient dès lors une précieuse et courante réaction de laboratoire. UHLENHUTH, en 1901, décrit le test de précipitation en tant que procédé médico-légal et NUTTAL étudie la stricte spécificité des espèces animales. La notion de l'hypersensibilité d'un organisme ayant reçu des injections répétées de

substances albuminoïdes, découle des expériences de RICHET et PORTIER (1902), puis de celles d'ARTHUS ; il va en découler la découverte de l'anaphylaxie et celle de la vaccination antianaphylactique, ainsi que des états allergiques et des processus de sensibilisation et de désensibilisation.

Les termes « antigène » et « anticorps », créés par DEUTRE-DEUTSCH en 1899, correspondent à la définition suivante : on dit d'une substance qu'elle est « antigène » lorsqu'elle provoque dans l'organisme où elle est introduite, l'apparition d'« anticorps » spécifiques. Réciproquement l'anticorps est caractérisé par la nouvelle propriété acquise par le sérum de l'animal ayant reçu l'antigène, de donner avec cet antigène des réactions spécifiques. C'est ainsi qu'un immun-sérum peut être capable de neutraliser une toxine (antitoxine), de provoquer le groupement en amas d'une suspension microbienne (agglutinine), de faire apparaître un précipité floconneux au sein d'une solution (précipitines), de lyser certaines cellules (lysines ou sensibilisatrices), de fixer le complément, etc.

Pour répondre à ces fonctions, la substance injectée doit être étrangère à l'organisme qu'il s'agit d'immuniser (*Loi de l'hétérogénéité*). En dehors de rares exceptions, tels que les iso-anticorps, mis en évidence chez les chèvres par EHRLICH et MORGENROTH, cette loi de l'hétérogénéité est l'une des caractéristiques de la fonction antigénique.

De même, l'antigène doit-il être dans un certain

état de « solubilité », lui permettant de pénétrer intimement l'organisme dans lequel il est injecté. Classiquement, un antigène, doit contenir des protéides dans sa molécule. On admet actuellement que des corps non protéidiques tels que, par exemple, le glucoside de l'ammanite phalloïde, toxine végétale, sont capables de provoquer des anticorps tout comme certains polyholosides extraits de bactéries ne contenant pas de protéides dans leurs molécules (BOIVIN et ses collaborateurs). Il n'en reste pas moins vrai que dans l'ensemble « les protéides naturels constituent les exemples les plus démonstratifs » (SANDOR) des substances douées de la propriété antigène.

Quant à la spécificité des réactions antigène-anticorps, elle se démontre couramment, et depuis longtemps par de nombreuses applications pratiques : réactions d'agglutination, de fixation du complément, d'absorption élective et d'inhibition spécifique des réactions de précipitation (LANDSTEINER et HALBAN). Mais l'étude de la spécificité sérologique devait montrer que la spécificité des immunsérums n'était pas absolue et qu'à un antigène inoculé correspondaient de multiples anticorps réagissant non seulement avec un sérum des espèces voisines de l'animal expérimenté, mais avec celui d'espèces plus éloignées dans l'échelle zoologique. Les travaux de NICOLLE, DEBAINS, CESARI, de LANDSTEINER, de WELSH et CHAMPAN mirent rapidement en évidence que les antigènes naturels étaient toujours de nature complexe et comme constitués par le groupement d'un grand nombre d'anti-

gènes partiels. Parmi cette « mosaïque » d'antigènes (M. NICOLLE), il en est de « secondaires », et de « dominants », imprimant ainsi aux réactions une allure spécifique plus ou moins prononcée.

Cependant, à la suite des travaux de FORSSMAN, une nouvelle notion, celle d'« antigènes incomplets » vient enrichir l'Immunologie. LANDSTEINER en 1921 et LANDSTEINER et SIMMS en 1923, devaient interpréter le rôle de ces substances qui, capables de donner *in vitro* des réactions d'immunité, ne développent pas d'anticorps chez les animaux injectés. Le nom « d'Haptène » ou « Halbantigen » (LANDSTEINER), d'« antigène résiduel » (ZINSSER), fut donné à cette fraction alcoolosoluble des antigènes.

L'intérêt de ces recherches réside en ce fait qu'il est possible de reconstituer un « antigène complet » (Vollantigen) en recombinant l'haptène avec un protéide quelconque. Bien plus, des substances à l'état de très forte dispersion colloïdale et à poids moléculaire élevé telles que le kaolin, le collodion, le charbon animal, l'hydroxyde d'aluminium, sont capables de régénérer le pouvoir antigène complet. Par contre, les matières protéiques elles-mêmes, ne peuvent pas toutes activer les haptènes : il faut qu'il existe, dans leur constitution, un acide aminé aromatique ; tel est le cas de la gélatine qui, contenant de la phénylalanine mais pas de tryptophane ni de tyrosine, ne peut régénérer le pouvoir antigénique.

Cette conception de certaines substances antigènes supportant plusieurs haptènes, et des haptènes com-

muns, devait expliquer les réactions croissées observées en immunologie. Elle transportait la spécificité biologique sur un plan chimique en permettant de différencier un « support » de nature colloïdale généralement protéidique et une « fonction » supportée, agent de la spécificité de l'antigène, substance chimique appartenant au groupe des lipides, des glucides ou des protéides. L'étude des haptènes a montré que les propriétés physico-chimiques d'un antigène conditionnent sa spécificité antigénique (DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et N. KOSSOVITCH). Le phénomène de la spécificité se trouvait donc ramené à une étude physico-chimique.

Des travaux antérieurs avaient pu déjà laisser soupçonner le rôle qu'allait jouer la chimie dans l'immunologie. OBERMAYER et PICK en 1906, avaient montré que l'iode, le brome, les acides nitreux ou nitriques altéraient les protéides du sérum en leur conférant une nouvelle spécificité qui remplaçait la spécificité de provenance. D'autres procédés conduisaient, du reste, à des résultats semblables, par des procédés physico-chimiques tels que le chauffage. Mais il était difficile dans ces expériences de préciser la nature exacte du changement chimique qui présidait à l'apparition de ce nouveau pouvoir antigénique. Des travaux de BAUER et STRAUSS en 1929, de WORMALL en 1930 sur la nitration des protéides, il semblait ressortir que la spécificité pouvait être dévolue aux modifications apportées sur les noyaux aroma-

tiques encore que celles-ci ne fussent pas, sans doute, les seules responsables.

Un réel progrès résulte de l'application par LANDSTEINER de la technique décrite par PAULY en 1904 et qui consiste essentiellement à copuler un protéide avec un sel de diazonium. Après de nombreuses recherches, LANDSTEINER obtient ainsi, en 1918, des « azoprotéides ». Ces nouveaux antigènes ne diffèrent, en somme, que par la nature du groupement aromatique introduit dans les protéides. Ils restent solubles et conservent leur pouvoir antigène. Grâce à eux, on a la possibilité, d'obtenir des antigènes relativement simples et connus, d'étudier logiquement les différents immunsérums obtenus par leur injection. De fait, cette technique expérimentale démontre le peu d'importance, dans la spécificité sérologique, de la fraction protéidique de l'antigène et le rôle essentiel joué par les azocomposés. De plus, LANDSTEINER et HALBAN mettent en lumière, le pouvoir inhibiteur de la réaction antigène-anticorps, lorsqu'il existe une relation chimique trop étroite entre l'haptène et le groupe spécifique de l'antigène.

Des études sur la stéréoisomérisie entreprises par LANDSTEINER et Van der SCHEER montrent que les séroréactions font ressortir une différence nette de spécificité entre les isomères dans le cas des acides *d* et *l* des acides *p*-amino-benzoïl-phénylaminoacétiques et des acides *d,l*, *m*, tartraniliques. En 1929, AVERY et GOEBEL montrent l'influence de l'isomérisie optique en étudiant le glucose et le galactose. DUJAR-

RIC de la RIVIÈRE et KOSSOVITCH arrivent aux mêmes conclusions au cours de leurs recherches sur les formes d , l , dl , de l'histidine et de la leucine. La connaissance du rôle joué dans les processus d'immunité par les phénomènes d'asymétrie apparaît donc de toute première importance. Il semble bien que l'orientation dans l'espace d'un groupement, détermine le phénomène de la spécificité. Ce rapport entre les séroréactions et la structure chimique de l'antigène se manifeste même par des antigènes composés de substances chimiques inorganiques, telles que cuivre, fer copulés à la molécule protéidique.

Cette constatation doit être rapprochée du pouvoir sensibilisant conféré à certaines substances telle que la phénylène diamine, étudiée d'abord par PASTEUR-VALLERY-RADOT et K. MAYER, puis par TRÉFOUEL, NITTI, BOVET et DEPIERRE en 1937. Le pouvoir sensibilisant de ce corps est lié à deux facteurs : d'une part la structure moléculaire pour laquelle la position para développe la production de phénomènes allergiques, d'autre part l'activité de la molécule est exaltée par les radicaux tels que NH^2 , CH^3 , OCH^3 . Divers auteurs et notamment LANDSTEINER, ont étudié un grand nombre de substances douées d'un certain pouvoir sensibilisant sur l'animal. Löw en 1924, continuant l'étude du phénomène de sensibilisation expérimentale connu depuis RICHET et PORTIER, reproduit chez l'homme un état d'hypersensibilité avec des extraits de *Primula*.

BLOCH et STEINER sensibilisent la peau des cobayes

avec des primulines cristallisées : LANDSTEINER et JACOB utilisent comme sensibilisant le chloronitrobenzène et l'arsénobenzol. De simples composés chimiques peuvent d'après FIERZ-DAVID, JADASSOHN et STOLL, sensibiliser les animaux. LANDSTEINER provoque le choc anaphylactique chez l'animal sensibilisé avec des azoprotéides, en injectant des azocomposés bien définis contenant le même groupe spécifique.

Mais la question qui a fait l'objet des recherches les plus attentives reste encore celle qui a trait aux différents complexes de certaines bactéries. RUFUS, COLE, DOCHEZ et AVERY en 1917 extraient de l'urine des pneumococciques, un sucre dont ils poursuivent l'étude. Bientôt l'activité immunologique de plusieurs glucides fut démontrée et en 1923 HEIDELBERGER, AVERY, GOEBEL établissent que le caractère antigénique du pneumocoque dépend du polyholoside et concluent à la nature glucidique de la substance spécifique. Le rôle même de la structure de la molécule glucidique découle des faits décrits par AVERY, GOEBEL, WADSWORTH et BROWN; la nécessité du volume de la molécule ou des chaînes de molécules résulte des travaux de HEIDELBERGER, KENDALL et SCHERPEN en 1935, de HORNUS et HENDERS en 1936.

Les recherches de BOIVIN, de JON et LYDIA MESROBEANU en 1933, les ont entraîné à considérer l'antigène somatique bactérien comme formé par l'union d'un polyholoside spécifique et d'acides gras. Un antigène complet glucido-lipidique peut être extrait

de nombreux bacilles et l'on peut, par élimination des acides gras, conserver l'holosido-haptène. Ce polyholoside libre est, seul, le support de la spécificité, ce qui est démontré par son comportement sérologique, car il agit exactement comme le complexe ou antigène complet. RAISTRICK et TOPLEY en 1934, en partant d'une méthode différente, arrivent aux mêmes résultats et confirment l'existence d'antigènes bactériens non protéidiques.

D'autre part, MACHEBEUF et ses collaborateurs ont poussé très avant l'étude des haptènes du bacille de Koch. Ils montrent que l'activité haptène de fixation des extraits de ce bacille est due à des lipides et non à des impuretés fixées à ces lipides. Ces lipides actifs voisins des phosphatides, diffèrent des phosphatides vrais du bacille tuberculeux qui se montrent totalement incapables de fixer l'alexine en présence de sérums tuberculeux.

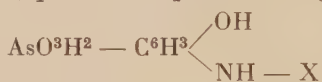
Par la transformation de l'immunologie en une science nouvelle à données plus rigoureuses, l'immuno-chimie, il apparaît indispensable de se cantonner dans l'étude d'antigènes chimiquement définis. La préparation relativement facile de ces antigènes bien déterminés et l'étude de leurs réactions comparées à leur structure, permettent d'espérer que l'on pourra apporter quelque clarté dans les phénomènes si complexes qui font de l'immunité l'un des problèmes biologiques les plus ardu.

Il nous a paru intéressant d'étudier la spécificité sérologique d'un certain nombre de composés arsénicaux, que nous nous sommes efforcé d'introduire dans la molécule protéidique.

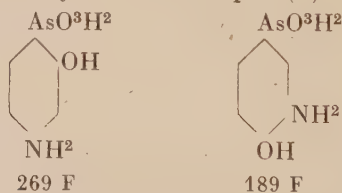
Dans une autre série d'expériences nous avons remplacé le protéide par l'histamine.

Nous avons préparé nos antigènes à partir des acides oxy-arsaniliques et de leurs dérivés aminés substitués. Dans ces dérivés, la fonction AsO^3H^2 est toujours conservée intacte ; on a substitué l'un des hydrogènes du groupement aminé —NH—X par des radicaux divers des acides carboxyles de la série acyclique : acétyl, propionyl, formyl.

Ils répondent, par conséquent, au type général :



Nous apportons les résultats de nos recherches sur les dérivés de deux isomères, ceux de l'acide oxy-arsanilique du type orsanine (acide-*p*-amino-*o*-oxyphénylarsinique ou 269 F), et du type stovarsol (acide *m*-amino-*p*-oxyphénylarsinique ou 189 F) différant l'un de l'autre par la position des fonctions —NH^2 et —OH dans le noyau benzénique (1).



(1) Ces composés ont été préparés au laboratoire de M. FOURNEAU et mis à notre disposition par M. TRÉFOUEL que nous remercions vivement.

CHAPITRE PREMIER

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES ÉTUDIÉS

Nous avons préparé des antigènes en copulant — après diazotation — les deux isomères avec des protéides (sérum de cheval, de porc). Pour cette préparation, nous avons suivi la technique préconisée par LANDSTEINER et LAMPL. Nos deux composés, contenant une fonction aminée fixée au noyau, en position convenable, sont donc facilement diazotables. La diazotation a été effectuée selon la méthode décrite par H. PAULY, méthode qui est devenue classique.

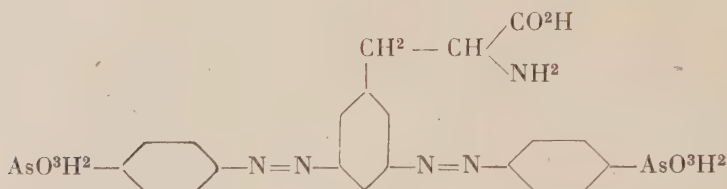
Diazotation et copulation

La diazotation et la copulation de l'acide arsénique peuvent nous servir d'exemple.

On commence par déplacer l'acide nitreux par l'action de l' HCl sur le nitrite de sodium, cet acide nitreux naissant, donne le chlorure de diazonium, en présence de l'amine.

Si ce produit ainsi obtenu est mis en contact avec

une substance copulable, il se forme un composé azoïque. PAULY a montré qu'un chlorure de diazonium combiné avec la tyrosine forme le produit suivant :



De plus, PAULY montre que si l'on fait réagir en milieu alcalin un protéide avec un sel de diazonium ou son dérivé atoxyl, la tyrosine et l'histidine du protéide se fixent sur le chlorure de diazonium ; il se forme un colorant rouge en milieu alcalin et jaune en milieu acide.

Cette technique comporte trois opérations différentes : diazotation de l'amine, copulation avec des protéides et précipitation de l'antigène.

1^o *Diazotation*. — Nous avons opéré d'après la méthode classique. Tout d'abord nous avons préparé le chlorhydrate d'amine en employant 2 molécules 1/2 d'acide chlorhydrique N pour une molécule d'acide aminé, répondant à la formule suivante :



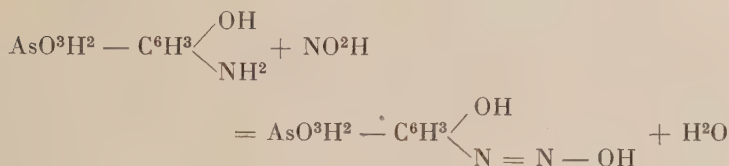
Dans ce but on dissout 2 grammes de substance dans 30 cc. d'HCl normal ; puis on ajoute goutte à goutte, en agitant, une solution normale de nitrite de sodium, jusqu'au bleuissement du papier iodo-

amidonné. Pour éviter la décomposition du sel de diazonium, la réaction s'effectue à basse température (entre 0 et + 5°) dans un récipient entouré de glace. La réaction dure environ 30 minutes.

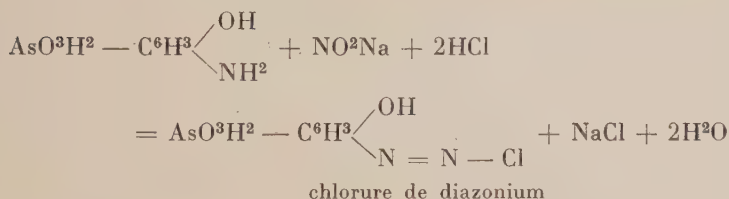
L'acide nitreux naissant du mélange



agit aussitôt formé sur le produit aminé :



Mais en présence d'acide chlorhydrique en excès il se forme le chlorhydrate



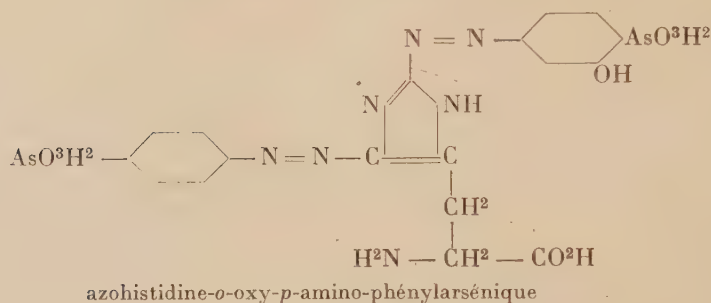
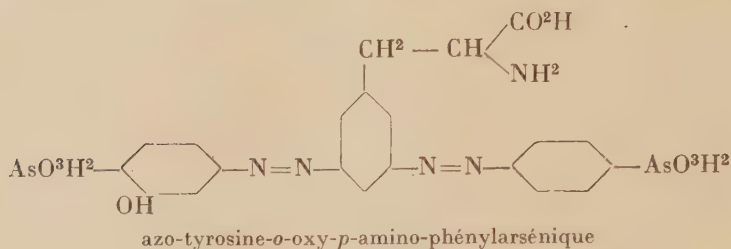
2° *Copulation*. — Le chlorure de diazonium ainsi obtenu se copule avec le protéide en milieu alcalin.

PAULY, le premier, avait décrit cette méthode que LANDSTEINER et ses collaborateurs ont appliquée à l'étude des azoprotéides.

D'après PAULY, deux aminoacides participent électivement à la conjugaison des protéides avec les sels de diazonium : la tyrosine et l'histidine.

Cet auteur a démontré que deux sels de diazonium

se fixaient sur une molécule de tyrosine en ortho par rapport à l'hydroxyle.



Pour effectuer la copulation nous avons utilisé comme protéide le sérum de cheval ou le sérum de porc. La technique est la suivante : on ajoute goutte à goutte, tout en agitant constamment, le chlorure de diazonium à 150 cc. de sérum alcalinisé par 300 cc. de CO_3Na^2 N. On opère dans la glace à une température inférieure à 5° afin d'éviter toute élévation de température préjudiciable. La copulation s'effectue au fur et à mesure que l'on ajoute le sel de diazonium. Il est indispensable que la réaction du milieu soit alcaline ; dans le cas contraire, il convient d'ajouter un certain volume de carbonate à la solution de diazonium.

Tous ces produits azoïques simples ont une coloration rouge plus ou moins foncée. D'une façon générale, la nuance des colorants est d'autant plus foncée que le poids moléculaire est plus élevé.

On laisse reposer cette solution pendant environ une heure, toujours dans un récipient entouré de glace.

3^o Les azoprotéïdes ainsi formés sont en solution à l'état de sel de sodium. La précipitation s'effectue par l'acide chlorhydrique 5 N en présence de rouge Congo.

Cette méthode de précipitation nous a paru préférable à celle du salage.

Pour séparer facilement le précipité, nous avons filtré la solution sur Büchner ou centrifugé. Le dépôt obtenu après filtration ou centrifugation est lavé à l'eau distillée légèrement acidulée, puis redissout en milieu faiblement alcalin. Pour purifier les produits, nous les avons précipités à nouveau en milieu acide et dissout une dernière fois dans une solution faiblement alcaline. Après quoi, on ramène au *pH* voisin de 7 — 7,4.

Un excès de sels minéraux pourrait gêner la dissolution du précipité (phénomène de relarguage), et nécessiterait une dialyse de la solution. Dans ce cas, la dialyse s'effectuerait dans des sacs de collodion d'abord pendant 24 heures contre l'eau courante, puis pendant 24 heures contre l'eau distillée.

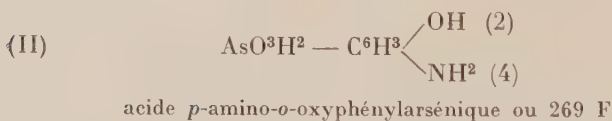
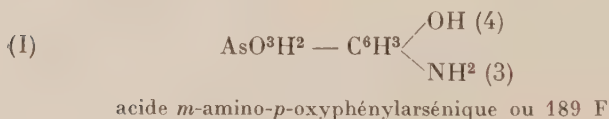
Pour calculer la concentration des solutions obtenues après la séparation, nous avons préparé une

partie en poudre en séchant le précipité après lavage à l'eau distillée. Ce procédé nous permet de préparer les solutions d'une concentration voulue. Nous avons conservé nos antigènes après neutralisation en solution, parce qu'on a de grandes difficultés pour redissoudre la poudre et obtenir de nouveau une solution d'antigène.

Il faut conserver les dilutions à l'abri de l'air, car la plupart de ces composés sont très oxydables.

Préparation des antigènes à partir des acides oxyaminés dont le groupement NH^2 est bloqué.

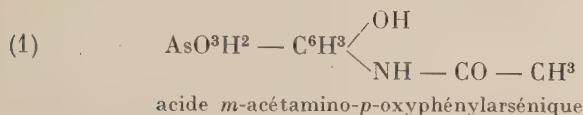
Nous avons manipulé dans nos recherches avec les dérivés des deux isomères étudiés plus haut.



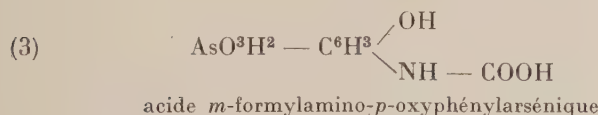
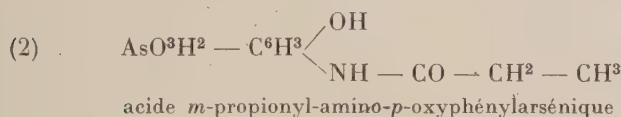
dans lesquels la fonction aminée est remplacée par les radicaux cycliques à fonction carboxyle : acétyl, propionyl, formyl.

Voici les dérivés obtenus par le remplacement de la fonction aminée dans les deux isomères suivants :

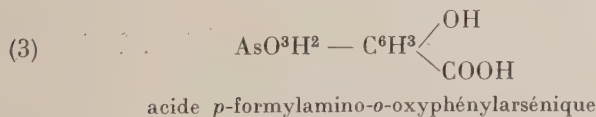
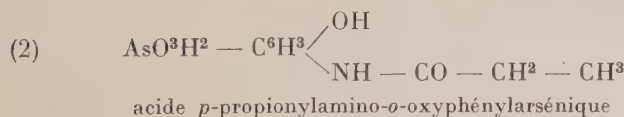
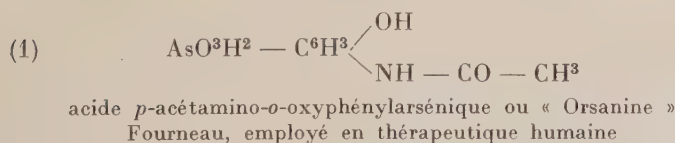
Dérivés du 189 F :



Par l'introduction du groupe acétyl dans la fonction aminée se forme l'acide connu sous le nom Stovarsol. Ce produit acide 3-acétyl-amino-4-oxyphénylarsénique, préparé par FOURNEAU, est employé en thérapeutique humaine.



Dérivés du 269 F :



Quelques considérations sur les propriétés des corps

ainsi obtenus. Par l'introduction des radicaux dans les groupements aminés on augmente le poids moléculaire sans changer notablement le pourcentage d'arsenic. ROTHERMUNDT et BURSCHKIES ont noté que la diminution du pourcentage d'As n'influence presque pas les propriétés toxicologique et thérapeutique de ces corps. Cependant les effets pharmacologiques dépendraient de l'introduction du nouveau radical sur la fonction aminée. Le blocage de la fonction $\text{NH}^2(\text{NH} - \text{X})$ diminue la toxicité du produit. D'autre part ce nouveau corps obtenu est plus toxique si sa molécule est plus lourde.

Ces nouveaux corps sont insolubles dans l'eau et solubles dans les alcalis faibles. Leur titrage s'obtient par injection sous-cutanée ou intraveineuse à des souris infectées par des trypanosomes et des spirochètes.

La préparation de ces derniers antigènes diffère de celle que nous avons utilisée pour nos premiers produits. En substituant un H par un radical, on bloque la fonction aminée qui peut être diazotable.

Pour la diazotation on est obligé de recourir à un produit diaminé tétrazotable. Dans ce but nous avons eu recours à la benzidine qui est une paradiamine répondant à la formule suivante :

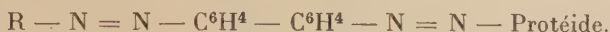


Ce corps possède deux groupements aminés qui sont tétrazotables et capables de fixer successivement deux substances.

C'est ainsi que nous avons pu fixer d'un côté de

la molécule benzidinique d'abord le produit arsenical et de l'autre côté le protéide.

La formule générale suivante représente le corps ainsi obtenu :

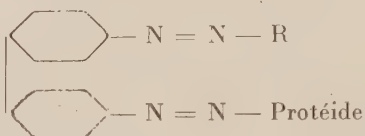


La préparation de ces antigènes exige une technique différente de celle utilisée pour nos premiers produits. Elle comprend quatre phases. Nous nous proposons en effet, de substituer un radical cyclique, acétyl, propionyl ou formyl à l'H de la fonction aminée des produits de départ : 189 F et 269 F. Il convient donc de choisir une diamine permettant la diazotation et la copulation entre le protéide et nos substances arsenicales à étudier (haptène). Dans ce but nous avons utilisé la benzidine qui possède deux fonctions aminées attachées aux deux noyaux : soit



Grâce à ses deux fonctions aminées la benzidine peut être diazotée deux fois — tétrazotée — et peut être copulée successivement avec le corps arsenical (haptène) et avec le protéide. C'est ainsi que nous avons pu fixer sur un diazonium, le protéide et sur l'autre le corps arsenical obtenu à partir des acides 189 F et 269 F en substituant l'H de la fonction

aminée. Le produit final peut alors être représenté par la formule suivante :



Il convient d'insister sur ce point qu'il est nécessaire d'employer comme diamine, la benzidine qui possède seule ces propriétés. Nous avons opéré selon la méthode de NIETSKI qui précise sa technique au cours de travaux fondamentaux sur la préparation des matières colorantes à partir de la benzidine. C'est ainsi que pour obtenir le Congo corinthe, il faut copuler la benzidine diazotée avec 1 molécule d'acide naphthionique et 1 molécule d'acide α -naphthol α -sulfonique ; pour obtenir le jaune Congo, il faut copuler la benzidine avec 1 molécule d'acide salicylique et 1 molécule de phénol. Nous avons donc appliqué dans la préparation de nos complexes antigéniques, cette technique si souvent utilisée dans la fabrication industrielle des différentes matières colorantes. On peut *grosso modo*, distinguer trois phases au cours de ces manipulations.

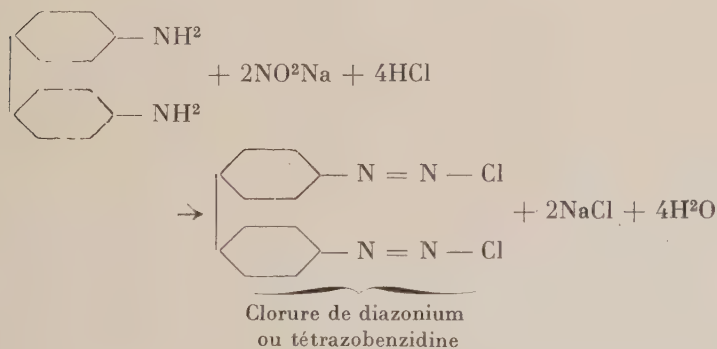
a) Tétrazotation.

b) Copulations en deux phases d'abord d'un diazonium avec le radical arsénique, puis de l'autre diazonium avec le protéide.

c) Précipitation du corps ainsi préparé et enfin, purification.

Ces différents temps peuvent être ainsi décrits :

a) *Tétrazotation*. — D'abord nous avons préparé le chlorhydrate de benzidine. Pour cette préparation nous avons employé la technique préconisée par LÉFÈBRE, CAIN et THORPE, nous avons dissout 1 gr. 84 de benzidine dans 30 cc. d'acide chlorhydrique normal et à chaud. Après avoir refroidi la solution dans un récipient entouré de glace jusqu'à une température oscillant entre 0 et + 5°, nous avons ajouté 3 cc. d'acide chlorhydrique concentré, puis 1 gr. 44 de nitrite de sodium en solution aqueuse. (Cette réaction revient à employer 1 molécule de benzidine et 2 molécules de nitrite de sodium.) La solution doit être claire et teinter légèrement en bleu le papier iodo-amidoné. Le corps final de cette réaction peut être représenté par la formule



b) *Copulation*. — 1^{re} copulation d'un diazonium avec le radical arsénique.

La solution du produit arsenical a été préalablement alcalinisée par 50 cc. de carbonate de soude concentré. On verse alors goutte à goutte dans cette

solution, la tétrazobenzine de façon qu'une molécule de l'un réagisse sur 1 molécule de l'autre. Le mélange est ensuite refroidi et agité pendant 2 à 3 heures.

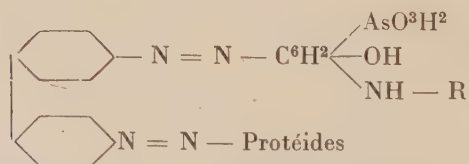
2^o Copulation du corps intermédiaire avec le protéide-sérum de cheval pour l'immunisation, et sérum de porc ou de lapin pour les immunoréactions.

Dans ce but, nous avons acidifié la solution par l'acide chlorhydrique de façon à obtenir une réaction légèrement acide au papier de tournesol ; nous avons obtenu ainsi le monochlorhydrate de diazonium ; puis nous avons ajouté une solution aqueuse contenant 2 grammes d'acétate de soude, et enfin 160 cc. de sérum de cheval.

Le mélange est bien agité pendant plusieurs heures et abandonné pendant une nuit.

c) *Précipitation.* — La précipitation se fait avec l'acide chlorhydrique 5 N, et selon la technique décrite plus haut.

Après toutes ces manipulations, nous avons obtenu un antigène de la formule suivante :



où R représente l'un des radicaux, acétyl, propionyl ou formyl, fixé à la fonction aminée des deux isomères, le 189 F et le 269 F. Par cette dernière méthode nous avons préparé six antigènes.

Le tableau suivant représente les antigènes préparés à partir des produits dont le groupement NH^2 est bloqué et dont la spécificité sérologique a été étudiée.

TABLEAU I

Formules des antigènes préparés et leur nom chimique	Les antigènes représentés par des lettres
(1) AsO^3H^2 $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^3 \end{matrix}$ (3) (4) OH $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{N} = \\ \text{N} - \text{protéides. Azoprotéides de} \\ 189 \text{ acétyl.} \end{matrix}$	A
(1) AsO^3H^2 $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^3 \end{matrix}$ (4) (2) OH $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{N} = \\ \text{N} - \text{protéides. Azoprotéides de} \\ 269 \text{ acétyl.} \end{matrix}$	B
(1) AsO^3H^2 $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{NH} - \text{CO}^2 - \text{H} \end{matrix}$ (4) OH $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{N} = \\ \text{N} - \text{protéides. Azoprotéides de} \\ 189 \text{ formyl.} \end{matrix}$	C
(1) AsO^3H^2 $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{NH} - \text{CO}^3\text{H} \end{matrix}$ (4) (2) OH $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{N} = \\ \text{N} - \text{protéides. Azoprotéides de} \\ 269 \text{ formyl.} \end{matrix}$	D
(1) AsO^3H^2 $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{CH}^3 \end{matrix}$ (3) (4) OH $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{N} = \\ \text{N} - \text{protéides. Azoprotéides de} \\ 189 \text{ propionyl.} \end{matrix}$	E
(1) AsO^3H^2 $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{NH} - \text{CO} - \text{CH}^2 - \text{CH}^3 \end{matrix}$ (4) (2) OH $\begin{matrix} \diagup \\ \text{C}^6\text{H}^2 \end{matrix}$ $\begin{matrix} \diagdown \\ \text{N} = \text{N} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{N} = \\ \text{N} - \text{protéides. Azoprotéides de} \\ 269 \text{ prop onyl.} \end{matrix}$	F

Le tableau ci-dessus représente les antigènes qui nous ont servi à immuniser les lapins et à effectuer les immunoréactions *in vitro* et *in vivo*.

Deux de ces antigènes que nous avons étudiés au point de vue de la spécificité sérologique sont des isomères dérivés de l'acide oxyarsanilique : orsanine (ou 269 F) et stovarsol (ou 189 F).

Six autres, sont des antigènes complexes ; ce sont des dérivés de deux isomères 189 F et 269 F dans lesquels un H de la fonction aminée est substitué par les radicaux acétyl, propionyl, formyl. Ces corps formés par la substitution sont fixés sur un diazonium de la benzidine tétrazotée, dont l'autre diazonium est copulé avec le protéide.

CHAPITRE II

PRÉPARATION DES IMMUNSÉRUMS ET SENSIBILISATION DES ANIMAUX

Les antigènes que nous avons préparés nous ont servi à immuniser et à sensibiliser différents animaux de laboratoire.

Immunisation des animaux

Pour l'étude des immunsérums, nous avons expérimenté sur le lapin qui se montre toujours un animal très sensible. Avant de commencer les inoculations, nous avons pris la précaution indispensable de vérifier que le sérum normal de l'animal opéré ne possède pas d'anticorps naturels susceptibles de précipiter avec le produit à examiner: il n'est pas rare, en effet, de constater que le sérum de certains lapins non inoculés jouit d'un pouvoir antagoniste vis-à-vis de l'antigène injecté, ce qui fausse les résultats.

La technique que nous avons utilisée pour immuniser les lapins consiste essentiellement à injecter par

voie intra-veineuse, dans la veine marginale de l'oreille, une solution de 2 à 3 cc. de notre antigène dilué à 2 et 3 %. Cette solution doit être faiblement alcaline afin d'être bien tolérée par l'animal. Les injections sont pratiquées tous les 3 jours et renouvelées 8 à 10 fois, selon la sensibilité individuelle. Enfin, 8 à 10 jours après la dernière injection, l'animal est laissé à jeûn pendant 24 heures, puis, saigné. Le sérum, recueilli stérilement, va permettre de pratiquer les différents tests de l'immunité : précipitation, fixation du complément, réaction d'inhibition spécifique de LANDSTEINER et HALBAN. Le sérum gardé en vue d'expériences ultérieures est conservé en ampoules scellées, dans un endroit frais à l'abri de la lumière.

Sensibilisation des animaux

Il est commode de s'adresser au cobaye qui se montre l'animal de choix dans les recherches sur l'hypersensibilité. Compte tenu des variations individuelles qui obligent à manipuler sur un lot considérable d'animaux, le cobaye se sensibilise aisément et réagit d'une façon constante.

Pour l'étude des phénomènes de la réactivité cutanée (phénomène d'ARTHUS, SHWARTZMAN, SANARELLI, PRAUSNITZ-KUSTNER), il nous a paru plus commode d'avoir recours au lapin car l'injection déchaînante est plus facile à pratiquer chez cet animal.

Nous avons le choix entre différentes méthodes

pour provoquer la sensibilisation. C'est ainsi que LANDSTEINER prépare les animaux au moyen d'une faible quantité d'antigène injectée dans le derme. La dose déchaînante est injectée par voie intraveineuse un mois après. Les différentes réactions allergiques lui permettent de mettre en évidence la présence de sensibilisine. Dans les cas où une seule injection déchaînante ne suffit pas, LANDSTEINER renouvelle au bout de 3 semaines cette dernière injection.

LANDSTEINER et JACOBS ont préconisé une autre méthode. Ils inoculent par voie intradermique, tous les jours pendant 10 à 18 jours de suite, une dose très faible, par exemple 15 milligrammes d'une solution de produit à étudier (néosalvarsan). Après 20 jours d'attente, ils injectent la dose déchaînante.

Nous avons utilisé tour à tour ces deux méthodes. Mais afin de réduire au minimum les pertes d'animaux, nous avons constamment pratiqué à partir de la 3^e injection intra-veineuse, la méthode de désensibilisation de BESREDKA : c'est-à-dire, que chaque injection intra-veineuse d'antigène était précédée, deux heures avant, d'une injection sous-cutanée ou intrapéritonéale de 1 ou 2 cc. de cet antigène.

CHAPITRE III

IMMUNO-RÉACTIONS

Nous avons pratiqué des immuno-réactions *in vitro* et *in vivo*.

A. — Réactions « in vitro ».

Dans le but d'étudier la spécificité sérologique de nos antigènes nous avons effectué des réactions croisées entre antigènes et immunsérums homologues et hétérologues. Les antigènes-tests pour les séroréactions ont été préparés en partant du sérum de porc.

L'emploi, pour la préparation de l'antigène devant servir aux réactions d'un sérum d'une espèce animale différente (porc) de celui qui avait été utilisé pour la préparation de l'antigène d'immunisation (cheval) a pour but de s'assurer que les réactions d'immunité ne dépendent pas du sérum injecté, mais bien du produit chimique en cause.

a) *Réaction de précipitation.* — En 1897, R. KRAUS, de Vienne, a découvert le phénomène suivant. Si on mélange en proportion convenable l'immunsérum

sérum (précipitine) avec l'antigène correspondant (précipitinogène), il se produit une précipitation. Cette réaction est simple et très précise.

Voici la technique que nous avons employée à 0 cc. 2 d'antigène. A des dilutions croissantes de 10^{-2} à 10^{-5} et au delà, on ajoute 2 à 3 gouttes d'immunsérum, on agite, on laisse en contact et on lit les résultats après deux heures au laboratoire et après une nuit de séjour à la glacière.

Au bout de ce laps de temps on obtient un précipité plus ou moins abondant dont on indique le degré d'intensité par la notation suivante : ++, +, ±, tr. (traces), tr. f. (traces fines), 0 signifie pas de précipitation.

b) *Réaction d'inhibition spécifique de la précipitation* [réaction de LANDSTEINER et HALBAN (1)]. Le principe de cette réaction strictement spécifique est le suivant ; dans un mélange antigène-anticorps, le précipitinogène ou la précipitine est en excès, la précipitation n'a pas lieu. Ainsi, si l'on met en présence, en proportions convenables, un antisérum et l'antigène correspondant, on obtient une précipitation. Si l'on ajoute à ce mélange, en rapports optima, un excès d'antigène ou d'haptène correspondant à l'immunsérum, la précipitation ne se produit plus. Au contraire, si on ajoute un antigène ou un haptène étranger, il ne se produit pas d'inhibition de la précipitation normale.

(1) *Münch. med. Wochenschr.*, 1902, n° 12.

c) *Réaction de fixation du complément.* — Cette réaction est basée sur le phénomène décrit par BORDET et GENCOU : si on mélange un antigène à un anticorps (immunsérum), privé de son complément par chauffage à 56°, à un sérum possédant le complément (sérum de cobaye) et à des globules rouges de mouton sensibilisés par un sérum hémolytique anti-mouton, deux faits peuvent se reproduire :

1) L'anticorps correspond à l'antigène ; dans ce cas le complément se fixe sur le complexe antigène anticorps et les globules rouges ne sont pas hémolysés ; la réaction est positive ;

2) l'anticorps ne correspond pas à l'antigène ; le complément libre se fixe sur les globules rouges sensibilisés, ces derniers sont hémolysés : la réaction est négative.

Pour effectuer cette réaction, tous les réactifs doivent être rigoureusement titrés.

Il faut s'assurer que l'antigène n'est pas anticomplémentaire, c'est-à-dire, qu'il ne fixe pas lui-même le complément, ce qui pourrait fausser les résultats.

Pour la réaction de fixation du complément, nous avons employé les proportions suivantes de réactifs : 0 cc. 2 d'antigène titré, 0 cc. 2 d'immunsérum chauffé préalablement au bain-marie à 56° pendant une demi-heure, 0 cc. 1 de complément titré. On amène la solution à 2 cc. (eau physiologique) et on laisse pendant une heure à l'étuve à 37°. On ajoute alors 0 cc. 5 de globules sensibilisés et on remplace à l'étuve pour une demi-heure. On lit le résultat. Il est indispen-

sable de faire des tubes témoins pour chaque réactif. La présence d'une sensibilisation spécifique dans l'immunsérum se manifeste par l'absence d'hémolyse.

B. — Réactions « in vivo ».

Ce sont des réactions biologiques qui permettent de mettre en évidence l'état allergique.

Après avoir pratiqué l'un des différents modes de sensibilisation que nous avons décrits, on déclenche chez les animaux ainsi sensibilisés, des symptômes locaux et des phénomènes généraux.

Intra-dermo-réaction. — Cette réaction présente de grandes analogies avec le phénomène classique d'ARTHUS. Cet auteur avait observé que plusieurs inoculations répétées de sérum de cheval, dans l'épaisseur du derme du cobaye, provoquaient une induration locale suivie d'une escarre.

Dans nos expériences, nous avons provoqué chez l'animal sensibilisé par une substance protéidique ou même simplement par certains corps chimiques, une réaction locale caractéristique en inoculant dans la peau, au même point, le même composé.

La zone de nécrose provoquée s'est montrée plus ou moins étendue suivant l'activité du produit sensibilisant. Dans certains cas, l'escarre produite peut être volumineuse.

Lorsque l'on opère sur un lot de cobayes, tous sensibilisés au même composé, il est intéressant de varier

le produit de l'injection déchaînante et d'étudier le rapport entre sa constitution et le caractère de l'escarre produite. Il est indispensable de s'assurer que ces substances elles-mêmes ne produisent aucune inflammation apparente chez des cobayes neufs.

Cette méthode est très employée actuellement pour étudier le pouvoir sensibilisant de certains composés chimiques et pour définir le groupe spécifique qui apparente certaines substances entre elles.

Choc anaphylactique. — RICHET et PORTIER découvrirent ce curieux phénomène en 1902 et lui donnèrent le nom d'anaphylaxie. ROSENAU et ANDERSON établirent en 1907, la stricte spécificité de cette réaction.

Si on pratique sur des animaux sensibilisés une injection dite « déchaînante », non plus par piqûre, dans l'épaisseur du derme, comme dans la réaction précédente, mais par voie intra-veineuse, on voit apparaître des troubles graves et souvent mortels qui constituent le « choc anaphylactique ». Chez le cobaye, ce phénomène se manifeste par de l'agitation, des convulsions, de la paralysie respiratoire souvent suivie de mort. Chez le lapin, la phase d'excitation est plus courte et la phase de paralysie plus longue.

Ce choc s'expliquerait par la formation d'un complexe entre la sensibilisine (anticorps anaphylactique) et le sensibiligène introduit dans la circulation.

L'injection déchaînante se pratique, chez le cobaye, soit dans les veines saphène ou jugulaire, soit dans le cœur. On peut opérer également par voie intra-

péritonéale : la sensibilité de la réaction est moins grande, mais on évite la mort par embolie.

Un animal ayant subi la sensibilisation passive par un immunsérum, peut présenter le phénomène de choc anaphylactique dès le lendemain si on lui inocule l'antigène correspondant.

D'après FIERZ-DAVID, JADASSOHN et STOLL, on pourrait sensibiliser ou déclencher la réponse anaphylactique sans utiliser un protéide hétérologue. La substance chimique en cause se couplerait, *in vivo*, avec les protéides de l'organisme et l'antigène obtenu réagirait.

Les récents travaux de LANDSTEINER ont montré qu'il est possible de provoquer le choc anaphylactique chez des cobayes sensibilisés avec des azoprotéides, par des injections d'azocomposés chimiquement définis, et contenant simplement le même groupe spécifique. Il était pourtant impossible ici d'envisager l'intervention des protéides de l'organisme, ces composés étant stables.

Réaction de Prausnitz-Küstner. — Cette réaction, découverte en 1921, permet de réaliser, *in vivo*, une précipitation antigène-anticorps qui se traduit par une inflammation locale. Elle ne demande pas une sensibilisation préalable des animaux. Il suffit de posséder un immunsérum frais provenant de n'importe quel animal (lapin). On inocule alors aux cobayes, par voie intra-dermique, un volume variant de 0 cc. 2 à 0 cc. 5 de sérum riche en anticorps, et, au bout de vingt-quatre heures, on injecte au même

point, 0 cc. 5 à 1 cc. de la solution d'antigène correspondant. Il se produit une réaction locale se traduisant par une nécrose rappelant celle due au phénomène d'ARTHUS, et plus ou moins importante suivant les proportions d'allergine et d'allergène en action.

Il est toujours nécessaire de faire des témoins qui ne reçoivent que l'immunsérum ou que la solution d'antigène.

Cette réaction permet de comparer facilement les rapports sérologiques existant entre plusieurs antigènes d'apparence très voisins, en traitant un lot de cobaye par le même anti-sérum et, en variant ensuite les antigènes dans la deuxième inoculation.

Phénomène de réactivité locale cutanée. — SANARELLI découvrit en 1924 le phénomène suivant : en inoculant des vibrions cholériques dans le péritoine des lapins et vingt-quatre heures après, un filtrat microbien quelconque par voie intra-veineuse, cet auteur observa une nécrose viscérale caractéristique.

En 1928, SHWARTZMAN découvrit une réaction non moins intéressante. Cet auteur préparait la peau des lapins par une première inoculation intra-cutanée de filtrat de *Bacterium coli* ou de bacille d'Eberth. Au bout de vingt-quatre heures (parfois même au bout de 6 ou 8 heures), il injectait par voie intra-veineuse, un filtrat microbien quelconque. Il constatait alors, à l'emplacement de la première inoculation une réaction congestive de la peau avec des taches hémorragiques ou une escarre avec zone inflammatoire.

Il nous a paru intéressant d'utiliser le principe de

cette réaction, en employant les antigènes à caractère chimique que nous avons préparés. Nous avons suivi la technique de SHWARTZMAN : une inoculation intra-cutanée de notre antigène ; au bout de vingt-quatre heures, une deuxième injection dans la veine du lapin (ou du cobaye) de la même solution d'antigène à la même dilution. Au bout de quarante-huit heures, si la réaction est positive, on voit apparaître au point de la première inoculation (ou dans une zone voisine représentant un *locus minoris resistentiae*), une escarre plus ou moins étendue entourée d'une zone inflammatoire avec nécrose hémorragique.

Cette réaction ne ressemble à aucune autre manifestation de l'anaphylaxie. Elle se classe tout à fait à part.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

Nous donnons dans ce chapitre les résultats obtenus au cours de nos expériences pratiquées *in vitro* et *in vivo*.

A. — Immuno-réactions.

In vitro. — Pour faciliter la description, nous présenterons d'abord les résultats obtenus en étudiant la spécificité sérologique des dérivés arsenicaux des groupes Orsanine (269 F) et Stovarsol (189 F) et puis les résultats obtenus avec les six autres antigènes dérivés de ces deux corps, dont un H de la fonction aminée est substitué soit par acétyl, soit par propionyl, soit par formyl. Ces six nouveaux corps ont été copulés avec le protéide sérum de porc. Nous avons effectué les réactions homologues — antigène et anti-corps correspondants — et hétérologues ou réactions croisées.

Spécificité sérologique des dérivés arsenicaux des groupes Orsanine et Stovarsol. — Des inoculations ré-

pétées, aux lapins, de nos solutions, nous ont donné des immunsérums spécifiques. Pour l'étude des propriétés des anticorps formés dans les sérums nous avons utilisé *in vitro*, les réactions dont les différentes techniques ont été décrites au chapitre précédent.

Réaction de précipitation. — Nous avons effectué la réaction *a*) antigène-immunsérums correspondant et *b*) antigène 189 F et immunsérum préparé par inoculation avec 269 F et inversement. Dans tous les cas où il s'agissait du complexe antigène-anticorps homologues, nous avons observé un précipité à grains assez gros, se détachant très nettement dans le liquide clair.

Les immunsérums proviennent de lapins ayant subi de 8 à 10 injections d'antigène préparé avec le sérum de cheval. Les proportions de réactifs employés étaient : 0 cc. 2 d'antigène aux diverses dilutions et 11 gouttes d'immunsérum. Les antigènes pour la réaction de précipitation sont préparés avec le sérum de porc.

Témoins :

Antigène ou haptène + sérum normal = 0.

Antigène ou haptène + eau physiologique = 0.

Immunsérum + eau physiologique = 0.

Les tableaux II et III représentent les résultats obtenus avec les deux corps étudiés (voir page 38).

Ces tableaux montrent : *a*) la réaction antigène-anticorps homologue donne une précipitation jusqu'à dilution 5×10^{-3} à 10^{-5} ;

TABEAU II
Immunsérum anti-acide-m-amino-p-oxypénylarsinique (anti 189 F)

	Antigène : 189 F protéide						Antigène : 269 F Protéide			
	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100	1/200	1/500	1/1000
Dilutions des antigènes.....										
Lectures des résultats.....	+	+	++	+	±	tr.	0	0	0	0
Après 2 h. à la 40 du laborat....	±	±	++	++	±	tr.	0	0	0	0
Après 24 h. à la glacière.....										

TABEAU III
Immunsérum anti-acide-p-amino-o-oxypénylarsinique (anti 269 F)

	Antigènes : 269 F protéide						Antigène : 189 F protéide			
	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100	1/200	1/500	1/1000
Dilutions des antigènes.....										
Lectures des résultats.....	+	+	++	++	+	±	0	0	0	0
Après 2 h. à la 40 du laboratoire	±	±	++	++	+	±	0	0	0	0
Après 24 h à la glacière.....										

= Précipitation : 0 = pas de précipitation. tr. traces.

b) La précipitation n'a pas lieu dans le cas des réactions croisées, dans lesquelles on met en contact l'antigène et le sérum hétérologue ;

c) que l'origine du protéide ne joue aucun rôle, que les antigènes arsenicaux ont acquis un caractère spécifique nouveau, quelque soit l'origine du sérum, et que le caractère est en rapport seulement avec le groupe arsenical introduit.

Réaction de fixation du complément. — Avant d'effectuer la réaction de fixation type Bordet-Gengou-Wassermann, nous avons titré nos antigènes et constaté la dilution limitée non anti-complémentaire. Nous nous sommes ensuite efforcé de mettre en évidence la présence d'une sensibilisatrice spécifique dans notre immunsérum.

Nous avons employé la technique habituelle : 0 cc. 2 d'antigène titré mélangé avec 0 cc. 2 d'immunsérum décomplémenté et 0 cc. 1 de complément titré préalablement et comme indicateur, des globules rouges de mouton sensibilisés par le sérum hémolytique anti-mouton, préalablement titré.

Cette réaction nous a montré que les anticorps obtenus par immunisation des animaux avec les deux isomères à l'étude fixés sur différentes molécules protéidiques, sont strictement spécifiques pour chaque isomère.

Nous avons observé la fixation du complément dans tous les cas où le complexe antigène-anticorps était homologue. Dans les cas d'hétérogénéité, la réaction s'est montrée négative.

Nous avons constaté, comme pour la réaction de précipitation, la disparition de tout caractère d'espèce des protéides et l'apparition dans l'immunsérum d'une spécificité immunologique uniquement en rapport avec la constitution chimique.

La réaction de fixation de complément effectuée avec les antigènes préparés à partir du produit dont le groupement NH_2 a été bloqué, ne nous a pas donné de résultat positif.

Réaction d'inhibition spécifique de la précipitation (réaction de Landsteiner et Halban). Comme nous l'avons vu plus haut, il est possible d'empêcher la précipitation antigène-anticorps de se produire, par addition d'immunsérum en excès.

Dans nos expériences, pour observer une inhibition complète, nous avons ajouté au mélange antigène-anticorps homologue, en rapport optima, un excès d'antigène ou d'haptène correspondant à l'immunsérum; la précipitation ne se produit pas. Au contraire si on ajoute un antigène ou un haptène étranger, la précipitation normale n'est pas empêchée.

Voici les résultats que nous avons obtenus en effectuant la réaction d'inhibition avec les isomères à l'étude :

Antigène 269 F	Même antigène en excès
<u>Immunsérum anti-269 F</u>	<u>Immunsérum anti-269 F</u>
Précipitation	Pas de précipitation
Antigène 269 F	Même antigène 269 F
Haptène correspondant	Antigène 189 F
<u>Immunsérum anti-269 F</u>	<u>Immunsérum anti-269 F</u>
Pas de précipitation	Précipitation

Comme on le voit, la précipitation n'est empêchée que dans les tubes où on a ajouté en excès l'antigène ou l'haptène correspondant à l'immunsérum. Elle se produit, au contraire, dans le tube où on ajoute un antigène (ou un haptène) étranger. Nous avons obtenu le même résultat avec l'antigène 189 F. La réaction est spécifique.

Ces faits prouvent bien qu'il existe un rapport étroit entre la spécificité sérologique et la constitution chimique (isomérisie de position) de nos antigènes.

La différenciation sérologique des composés 189 F et 269 F présente un intérêt spécial. Ces deux isomères ont la même propriété toxique : ils sont neurotoxiques et ne diffèrent que par la position des fonctions — NH^2 et — OH dans la molécule.

Ce fait confirme la théorie d'EHRLICH qui veut que la fonction antigénique et la fonction toxique forment deux groupes différents dans la molécule protéidique : groupe « toxophore » et groupe « haptophore ».

En analysant tous ces tableaux représentant les réactions croisées ; on constate *a)* la stricte spécificité sérologique des antigènes complexes étudiés ; *b)* la disparition de l'espèce d'origine du protéide, à cette spécificité d'origine s'est substituée la *chimiospécificité*.

*
* *

Nous citons ci-dessous les résultats découlant des immuno-réactions obtenues avec les six antigènes

complexes et les immuno-sérums homologues et hétérologues.

Réaction de précipitation. — Nous avons utilisé la même technique qui a été décrite pour les « antigènes complexes » 189 F et 269 F. Les antigènes A, B, C, D, E, F, pour l'immunoréaction ont été préparés avec le sérum de porc.

La réaction antigène-anticorps homologue, donne une précipitation jusqu'à la dilution de 1 / 100.000 du produit antigénique.

La précipitation n'a pas lieu dans le cas des réactions croisées, dans lesquelles, on met en contact l'antigène et le sérum hétérologue.

Le remplacement de l'antigène par l'haptène correspondant a donné une légère précipitation et presque rien avec son hétérologue.

Les tableaux IV à IX montrent les résultats obtenus :

TABLEAU IV

Antigènes	Immun-sérum anti A						
A	tr.	±	tr.	0	0	0	0
C	+	+±	+	±	±	tr.	0
E	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	±	±	+	tr.
	0	0	0	0	0	0	0
	±	0	0	0	0	0	0
Haptènes							
189 acétyl	0	0	0	0	0	0	0
	tr.	±	±	+	±	±	tr.
189 formyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
189 propionyl	0	0	0	0	0	0	0
	+	±	±	tr.	0	0	0
Dilutions des antigènes ou haptènes	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000

La première ligne indique les résultats après 2 heures de séjour à la température de laboratoire et la deuxième ligne après un séjour de 24 heures à la glacière.

TABLEAU V

Antigènes	Immun-sérum anti B						
B	0	0	0	tr.	±	tr.	0
D	+	+	+	+±	+±	+	tr.
	0	0	0	tr.	tr.	0	0
F	±	±	±	tr.	tr.	0	0
	0	0	0	tr.	tr.	0	0
	±	±	+	+	+	±	0
Haptènes							
269 acétyl	0	0	tr.	tr.	tr.	0	0
	tr.	±	±	+	+±	++	tr.
269 fromyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	tr.	tr.	0	0	0
269 propionyl	0	0	0	0	0	0	0
	tr.	±	+	+	+±	++	+±
Dilutions des antigènes ou haptènes	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000

La première ligne indique les résultats après 2 heures de séjour à la température de laboratoire et la deuxième ligne après un séjour de 24 heures à la glacière.

TABLEAU VI

Antigènes	Immun-sérum anti C						
C	0	tr.	+	+++	++	++	0
	0	tr.	+	+++	++	++	+
A	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	+	+	±	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
Haptènes							
189 formyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	tr.	++	±	+	±	±
189 acétyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
189 propionyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	tr.	+	+	±
Dilution des antigènes ou haptènes	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000

La première ligne indique les résultats après 2 heures de séjour à la température de laboratoire et la deuxième ligne après un séjour de 24 heures à la glacière.

TABLEAU VII

Antigènes	Immun-sérum anti D						
D	0	0	0	±	±	tr.	0
	tr.	±	++	+±	±±	+	0
F	0	0	0	0	0	0	0
	tr.	tr.	±	+	±	±	0
B	0	0	0	0	0	0	0
	0	tr.	±	+	±	tr.	0
Haptènes							
269 formyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
269 acétyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
269 propionyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	tr.	+	+	++	+	±
Dilutions des antigènes ou haptènes	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000

La première ligne indique les résultats après 2 heures de séjour à la température de laboratoire et la deuxième ligne après un séjour de 24 heures à la glacière.

TABLEAU VIII

Antigènes	Immun-sérum anti E						
E	+±	+	±	tr.	tr.	0	0
	++++	++	+±	+	±	±	0
C	±	±	0	0	0	0	0
	++	++	+	tr.	0	0	0
A	0	0	0	0	0	0	0
	tr.	tr.	±	tr.	0	0	0
Haptènes							
189 propionyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	++	+	±	tr.	0
189 formyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
189 acétyl	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0
Dilutions des antigènes ou haptènes							
	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000

La première ligne indique les résultats après 2 heures de séjour à la température du laboratoire et la deuxième ligne après un séjour de 24 heures à la glacière.

TABLEAU IX

Antigènes	Immun-sérum anti F						
F	0 + ±	tr. ++	tr. + +	tr. + ±	0 +	0 ±	0 tr.
D	0 tr.	0 tr.	0 tr.	0 0	0 0	0 0	0 0
B	0 ±	0 ±	0 tr.	0 0	0 0	0 0	0 0
Haptènes							
269 propionyl	tr. ++	tr. ++	0 +	0 ±	0 ±	0 tr.	0 0
269 formyl	0 tr.	0 tr.	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
269 acétyl	0 tr.	0 tr.	0 tr.	0 ±	0 tr.	0 0	0 0
Dilutions des antigènes ou haptènes	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000

La première ligne indique les résultats après 2 heures de séjour à la température du laboratoire et la deuxième ligne après un séjour de 24 heures à la glacière.

Tous ces tableaux prouvent que l'introduction d'un groupement quelconque comme acétyl, propionyl, formyl dans la fonction NH^2 d'un produit aromatique à noyau benzénique, modifie considérablement la spécificité sérologique qui s'est montrée ici encore en relation étroite avec la composition chimique de l'acide arylaminé. Cette spécificité varie aussi avec la nature du groupement introduit sur la fonction aminée.

Réaction de fixation du complément. — Cette immunoréaction nous a donné des résultats moins nets que les autres réactions : précipitation et inhibition spécifique. La plupart de nos antigènes étaient anticomplémentaires.

Réaction d'inhibition spécifique. — Pour effectuer cette réaction, nous avons eu recours à la méthode préconisée par BERGER et ERLÉNMEYER. Nous avons employé la technique suivante :

Nous ajoutons 0 cc. 9 de la solution d'haptène à 0,2 pour cent à 0 cc. 2 de la solution d'antigène à 0,02 pour cent ; puis nous additionnons à ce mélange II gouttes de l'immunsérum homologue à l'antigène.

Nous avons fait varier cette méthode en la remplaçant par celle de Mutsaers. Elle consiste à remplacer l'eau physiologique servant à la dilution de l'antigène par une solution d'haptène. A cette différente dilution on ajoute deux gouttes de l'immunsérum.

Les tableaux X à XVI représentent les résultats obtenus en effectuant cette immunoréaction.

TABLEAU X

Immun- sérum anti	Haptène utilisé pour l'inhibition			Témoin
	189 F acétyl	189 F formyl	189 F propionyl	
A	0	++	++	++
B	++	0	++	++
C	++	++	0	++

TABLEAU XI

Immun- sérum anti	Haptène utilisé pour l'inhibition			Témoin
	269 F acétyl	269 F formyl	269 F propionyl	
B	0	++	++	++
D	++	0	++	++
F	++	++	0	++

Lecture après une nuit à la glacière.

Le tube témoin T ne contient que le mélange antigène-anticorps dans les conditions optima, il donne donc toujours une très forte agglutination.

TABLEAU XII

Haptène servant à la dilution de l'antigène	Immun-sérum anti A			
189 acetyl	±	tr.	0	0
189 formyl	+	+	++	±
189 propionyl	+	++	+	±
Dilution d'antigène ...	1/200	1/500	1/1000	1/10000

TABLEAU XIII

Haptène servant à la dilution de l'antigène	Immun-sérum anti B			
269 acetyl	0	0	tr.	tr.
269 propionyl	tr.	±	+	++
269 formyl	0	±	+	+
Dilution d'antigène ...	1/200	1/500	1/1000	1/10000

La solution d'haptène de 1 % a servi pour la dilution de l'antigène (1 %). Lecture après 24 h. à la glacière.

TABLEAU XIV

Haptène servant à la dilution de l'antigène	Immun-sérum anti C			
	0	0	0	0
189 formyl	tr.	+++	+++	++
189 propionyl	tr.	+++	+++	++
189 acétyl				
Dilution d'antigène ...	1/200	1/200	1/1000	1/10000

TABLEAU XV

Haptène servant à la dilution de l'antigène	Immun-sérum anti D			
	0	tr.	±	±
269 formyl	0	tr.	+	++
269 acétyl	0	tr.	+	++
269 propionyl	0	±	+	++
Dilution d'antigène ...	1/200	1/500	1/1000	1/10000

La solution d'haptène de 1 % a servi pour la dilution de l'antigène (1 %). Lecture après 24 h. à la glacière.

TABLEAU XVI

Haptène servant à la dilution de l'antigène	Immun-sérum anti B			
189 propionyl	±	0	0	0
189 formyl	+±	+	±	0
189 acétyl	+±	+	±	tr.
Dilution d'antigène ...	1/200	1/500	1/1000	1/10000

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par la méthode de Berger et Erlenmeyer.

L'analyse de ces tableaux montre que les haptènes utilisés en excès comme agents inhibiteurs ne précipitent pas avec l'immunsérum correspondant. L'inhibition n'est complète que lorsque l'haptène inhibiteur entre dans la constitution de l'azoprotéide immunisant.

B. — Immuno-réaction.

In vivo. — Une fois les animaux sensibilisés (1) par l'injection de nos antigènes, nous avons tenté de faire apparaître les réactions biologiques témoins de l'état allergique créé. Dans ce but, nous avons eu recours aux procédés déjà devenus classiques.

(1) Notre expérience a porté sur 62 lapins et 80 cobayes.

Pour provoquer ces phénomènes, nous avons utilisé la technique de SHWARTZMAN, légèrement modifiée.

L'animal a d'abord été sensibilisé par 2 ou 3 injections intraveineuses de 0 cc. 5 de nos antigènes, pratiqués à des intervalles de 2 jours ; puis une solution d'antigène à 10 % a été injectée intra-dermique à la dose de 0 cc. 5 ; 24 heures après cette injection préparante, nous avons injecté 3 cc. d'une dilution d'antigène à 3 %, dose déchaînante dans la veine.

Nous avons observé en suivant cette technique, 24 à 48 heures après l'injection déchaînante intraveineuse, l'apparition d'une réaction se manifestant par des phénomènes inflammatoires aigus d'intensité variable : formation d'une large escarre avec zone hémorragique (voir fig. 1 et 2).

Cette réaction a successivement été pratiquée avec nos antigènes préparés à partir de protéïdes d'origine différente : sérum de cheval, sérum de lapin, sérum de porc. Nous avons régulièrement constaté que les protéïdes transformés par l'introduction de nos hap-
tènes dans la molécule perdent tout caractère d'espèce.

Ces résultats concordent avec ceux d'OBERMEYER et PICK qui, les premiers, ont démontré la disparition du caractère zoologique dans le sérum d'un animal immunisé par un antigène complexe.

Parfois la plaque nécrotique est apparue du côté opposé du point de la première injection.

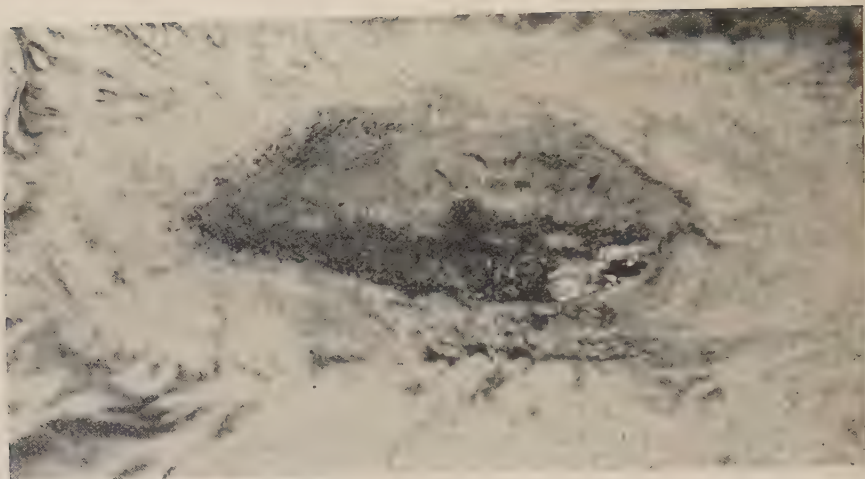


Fig. 1. — Phénomène de réactivité locale cutanée. Escarre de 2 jours (Lapin).
Injections préparante et déchainante de l'antigène arsenical A.



Fig. 2. — Phénomène de réactivité locale cutanée. Escarre de 3 jours (Lapin).
Injections préparante et déchainante de l'antigène arsenical B.

Les animaux témoins n'ont jamais manifesté de phénomènes cutanés locaux. Pour les provoquer, il a fallu après une première injection intradermique préparante, une deuxième injection intraveineuse déchaînante du *même produit*.

Nous avons injecté par voie intra-dermique chaque jour un de nos antigènes à un lot de cobayes. Dans 70 % des cas ces animaux ont réagi ; une escharre est apparue dès la 4^e ou la 5^e injection.

Nous avons aussi utilisé la technique récemment préconisée par LANDSTEINER pour sensibiliser ses animaux. Elle consiste à injecter en une seule fois un antigène par voie intra-dermique. Au bout d'un mois, l'injection déchaînante entraîne dans 75 % des cas, des phénomènes nécrotiques.

Réaction de Prausnitz-Küstner (P.-K.). — Nous avons obtenu une réaction locale très caractéristique par l'injection d'un antigène succédant à une première injection intra-dermique d'un immunsérum correspondant.

Une première dose de 0 cc. 3 à 0 cc. 5 d'immunsérum à 0,5 % est introduite dans le derme ; 24 heures après, une deuxième injection de 0 cc. 5 à 3 % est pratiquée au même endroit. Nous constatons une réaction cutanée locale nette allant jusqu'à l'apparition d'une plaque, au bout de 48 heures, lorsque l'antigène et l'immunsérum sont homologues. Il convient cependant de noter que tous nos antigènes n'ont pas donné des réactions aussi évidentes ; ainsi les antigènes C et D ne provoquent qu'une réaction dou-

teuse et les antigènes A et B n'en font apparaître aucune.

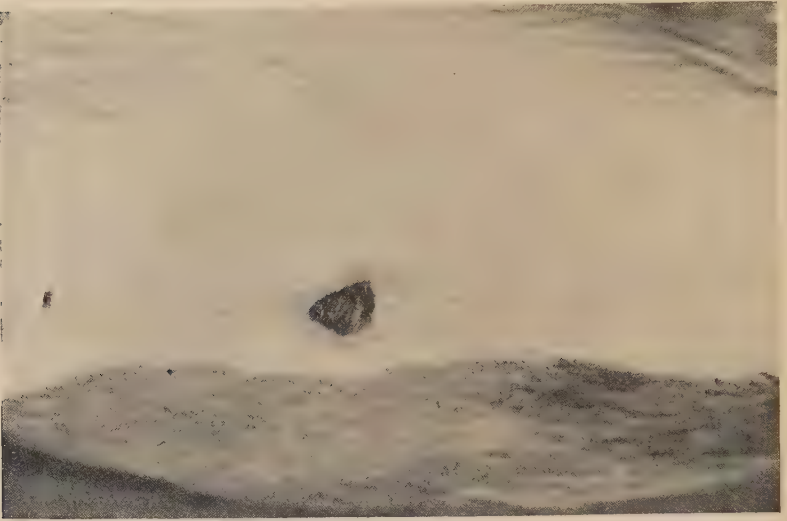


Fig. 3. — Réaction de Prausnitz-Küstner. Cobaye ayant reçu une injection préparante de sérum anti-E et une injection déchainante d'antigène E.

*
* *

Inhibition de la toxicité des antigènes arsenicaux par l'immunsérum correspondant.

Dans une autre série d'expériences nous avons étudié l'action *in vivo* des immunsérums sur les antigènes correspondants.

Dans ce but nous avons mélangé en différentes proportions l'haptène avec l'immunsérum engendré par lui.

Après avoir déterminé la dose mortelle de l'hap-

tène, nous avons mélangé l'haptène et différentes doses de l'immunsérum correspondant.

Nous avons fait ces expériences avec 269 F acétyl, 269 F formyl, 269 F propionyl, le 189 F formyl, 189 F propionyl, et le 189 F acétyl.

Nous avons pu constater que l'immunsérum, seulement dans certaines cas, a neutralisé la toxicité des composés arsenicaux. La survie des souris injectées avec le mélange haptène plus l'immunsérum correspondant dépasse en général celle des souris ayant reçu seulement l'haptène.

Dans une série d'expériences, nous avons préalablement injecté aux souris l'immunsérum et, de 2 heures à 24 heures après l'haptène. Les résultats de cette expérience concordent avec ceux de l'expérience précédente.

*
* *

Toutes ces réactions immunologiques nous ont permis de démontrer que les propriétés sérologiques et allergiques des antigènes chimio-spécifiques complexes sont en rapport étroit avec leur constitution stéréochimique et avec la nature des radicaux fixés sur le groupement aminé.

Le rôle même des protéides fixés paraît très réduit.

CHAPITRE V

PRÉPARATION DES ANTIGÈNES COMPLEXES DANS LESQUELS LE PROTÉIDE EST REMPLACÉ PAR L'HISTAMINE (AZOHISTAMINE).

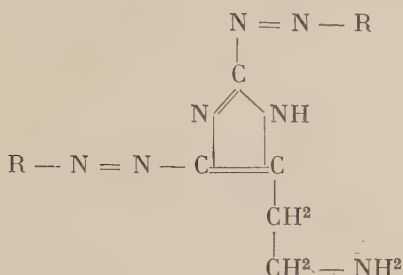
Dans une autre série d'expériences avec les antigènes chimiospécifiques nous avons essayé de remplacer le protéide par l'histamine.

La technique générale de la préparation de ces antigènes a été calquée sur celle de nos azoprotéides simples. Elle comporte deux phases, la diazotation de l'amine, puis la copulation avec l'histamine remplaçant le protéide dans les autres antigènes.

Nous avons employé 2 molécules d'amines pour une molécule de dichlorure d'histamine. Ces antigènes précipités, lavés et séchés peuvent se conserver longtemps en poudre sans altération. Nous avons ainsi préparé nos solutions par simple dissolution du produit en milieu légèrement alcalin, les antigènes obtenus nous ont servi à étudier nos réactions *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons ainsi préparé trois différents antigènes à partir de l'acide arsanilique et de deux isomères 189 F et 269 F.

La formule générale peut être représentée ainsi :



R représente le radical du produit aminé.

Réaction in vivo. — Bien que l'azohistamine ait donné une précipitation plus faible que les azoprotéides, les réactions cutanées ont donné un résultat satisfaisant.

Réaction de Praunitz-Kustner. — Une première injection de 0 cc. 5 d'azohistamine à 1 %, suivie d'une deuxième injection au même endroit, provoque la formation d'une nécrose cutanée apparente au bout de 48 heures.

Phénomène de Schwartzman. — Un lapin ayant reçu une injection de 0,15 intradermique puis après 24 heures, une deuxième intraveineuse forme un escare qui durcit après deux jours (fig. 4, page 58).

En examinant le tableau XVII, nous remarquons que le titre de l'immunsérum des azohistamines, est moins élevé que lorsque nous utilisons un azoprotéide de sérum.

Cela est dû probablement à l'absence de certains autres aminoacides existant dans le sérum servant à la préparation de l'antigène.

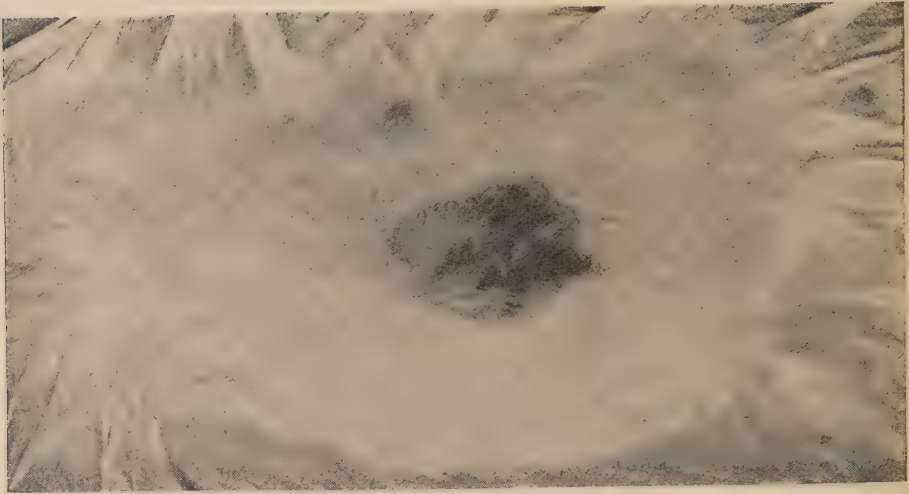


Fig. 4. — Phénomène de réactivité locale cutanée. Escarre de 2 jours (Lapin). Injections préparante et déchaînante de l'antigène azohistamine de 269 F.

TABLEAU XVII

Immun sérum correspondant à l'antigène	Résultats					Témoin
Azohistamine de l'acide arsénique...	0	+ ±	+	±	0	0
Azohistamine de 189 F.....	0	0	tr.	±	+	0
Azohistamine de 269 F.....	0	tr.	±	+	±	0
Dilution de l'anti- gène.....	1/500	1/1000	1/5000	1/10000	1/100000	

Résultat lu après 48 heures à la glacière.

CHAPITRE VI

RECHERCHE DE L'ARSENIC DANS LE SÉRUM PROVENANT DES ANIMAUX IMMUNISÉS PAR LES SUBSTANCES ARSENIQUES

L'étude des corps antigéniques chimiquement définis nous a incité d'entreprendre des recherches sur la corrélation entre la composition chimique de l'antigène et de l'anticorps précipitant (immunsérum) engendré par lui. Dans ce but, nous avons cherché l'arsenic :

- a)* dans l'antigène primitif ayant servi à immuniser nos animaux ;
- b)* dans l'immunsérum correspondant ;
- c)* dans le précipité provenant de la réaction antigène et l'immunsérum correspondant ;
- d)* dans le liquide surnageant obtenu après centrifugation.
- e)* dans les dernières eaux de lavage du précipité repris par l'eau physiologique.

Pour obtenir une quantité suffisante de précipité, nous avons choisi des immunsérums de titre élevé.

Nous avons employé la technique de la réaction de précipitation, en mettant en présence 1 cc. d'antigène à 1 % et 0 cc. 7 d'immunsérum correspondant.

Après avoir laissé pendant 24 heures à la température du laboratoire puis pendant 24 heures à la température de la glacière, le précipité contenu est centrifugé, décanté, lavé quatre fois à l'eau physiologique, mis à sécher dans le vide, puis pesé.

Technique

La première opération consiste à détruire les matières organiques. Pour cela nous pratiquons l'attaque par le mélange oxydant (70 cc. SO_4H^2 pur Bertrand, 10 cc. NO_3H pur, 20 cc. ClO_4H) sulfo-nitro-perchlorique. L'attaque se fait dans un ballon de Kjeldahl à feu doux jusqu'à complète décoloration. On chasse finalement les dernières vapeurs intenses par ébullition après avoir ajouté quelques cc. d'eau distillée.

On laisse refroidir ; on complète à 25 cc. dans une fiole jaugée dont on prélève 5 cc. du réactif de BOUGAULT (1).

Ce mélange est porté au bain-marie bouillant pendant une demi-heure. L'arsenic précipité en provoque un trouble dans la solution.

L'examen est fait par comparaison avec des tubes étalons au moyen d'un photolorimètre dont le principe repose sur les différences d'éclaircissement de deux cellules photoélectriques. Les mesures sont faites en lumière monochromatique bleue traversant deux solutions dont l'une sert de témoin (eau + réactif de Bougault).

(1) PO_3Na^3 20 grammes ; eau distillée 20 cc. ; HCl pur 200 cc.

Pour trouver la quantité d'arsenic dans la solution à examiner, il suffit d'établir une courbe étalonnée avec une série de solutions contenant de l'arsenic à dose déterminée (10-20 μ).

Après avoir porté 1/2 heure les tubes témoins et la solution à examiner dans un bain bouillant, on laisse refroidir et on lit au moyen de l'appareil photoélectrique. On peut ainsi établir le graphique en portant en ordonnée les divisions du diaphragme et en abscisse la teneur en arsenic. Il suffit de porter à chaque dosage en ordonnée la division du diaphragme observée avec la solution à examiner et de calculer sur le graphique, l'abscisse correspondante. Cette technique permet de déceler des teneurs en arsenic de l'ordre de 0,001 milligramme par cm³.

TABLEAU XVIII

Nature du produit pour la recherche d'arsenic	Taux d'arsenic en μ
20 cc. d'antigène arsenical à 1 % (même quantité servant à la précipitation)	4740
Immun-sérum correspondant	Rien
Précipité provenant de la réaction antigène-anticorps (poids : 0 gr. 37)	150
Liquide surnageant après centrifugation du préci- pité	4180
Quatrième eau de lavage du précipité	14

Les résultats rapportés dans le tableau XVIII permettent de constater qu'il n'y a aucune trace d'As dans l'immunsérum, préparé par injection d'antigène arsenical.

CONCLUSIONS

Nos expériences faites sur une série de dérivés des groupes orsanine et stovarsol et sur un certain nombre de protéides transformés par l'introduction dans leur molécule de substances arsénicales, nous ont conduit aux conclusions suivantes :

1^o Tous les azoprotéides arsenicaux que nous avons préparés ont provoqué la formation d'anticorps chez les animaux inoculés. Ces anticorps ont pu être mis en évidence soit *in vitro*, soit *in vivo*, et le plus souvent par ces deux moyens, à l'aide des réactions suivantes : *in vitro* : précipitation, fixation du complément, inhibition spécifique, et *in vivo* : recherche des phénomènes d'ARTHUS, de SANARELLI, SHWARTZMAN, de PRAUSNITZ-KÜSTNER.

2^o Les lapins immunisés à l'aide d'un azoprotéide arsenical réagissent en fabriquant des anticorps précipitant multiples ; l'immunisation des lapins par l'As-protéide de cheval entraîne la formation d'au moins deux groupes d'anticorps précipitants : a) Un anticorps provoqué par le groupement arsenical de la substance injectée. Cet anticorps peut être mis en évidence par la réaction de précipitation par l'haptène correspondant ou par l'antigène préparé à partir

d'un protéide d'une espèce animale différente de celle qui a servi à préparer l'antigène immunisant. En utilisant le sérum de cheval pour l'immunisation et le sérum de porc pour l'immuno-réaction nous avons toujours obtenu une précipitation qui peut seule entraîner la partie de l'antigène contenant l'arsenic.

b) Un anticorps provoqué par le protéide de l'espèce animale ayant servi à préparer l'immunsérum. L'immunsérum étudié précipite en présence de sérum dont il est issu. Les immunsérums provenant du sérum de cheval précipitent en présence d'un sérum neuf de cheval.

3° L'antigène arsenical d'une concentration 1,5 à 3 % provoque la formation d'un antisérum de titre élevé; pour une teneur plus élevée, 3 % et plus, l'immunsérum obtenu précipite faiblement.

4° La position des groupements fixés sur le noyau benzinique et l'introduction de certains radicaux, tels que acétyl, formyl, ou propionyl sur le groupement aminé confèrent au produit envisagé une nouvelle spécificité sérologique.

5° Nos expériences montrent que la spécificité sérologique dépend non pas des différents protéides, mais bien du radical chimique.

6° Nous avons trouvé une aide efficace pour différencier les antigènes utilisés pour l'immunisation dans la méthode qui consiste à comparer à certaines réactions de précipitation l'action inhibitrice d'haptènes à constitution chimiquement définie.

7° Les substances dans lesquelles l'histamine a rem-

placé la molécule de protéide, semblent capables de produire un immunsérum, mais celui-ci est de titre plus élevé, décelable notamment par les réactions sur le vivant.

8° La teneur en arsenic des précipitants reste constante lorsqu'on utilise, pour la précipitation, les Asprotéïdes hétérologues.

9° Les recherches entreprises pour déceler l'As dans les immunsérums préparés avec les complexes arsenoprotéïdiques se sont toujours montrées négatives.

10° Tous les corps arsenicaux étudiés sont toxiques. L'introduction de radicaux de poids moléculaire élevé dans les composés de type orsanine, stovarsol, etc... augmente la toxicité de ces produits.

11° Les essais d'inhibition *in vivo* de l'action toxique de nos haptènes ont donné dans certains cas des résultats positifs. Les souris injectées avec le mélange de plusieurs doses mortelles d'un haptène arsenical et de son immunsérum survivent plus longtemps que celles qui ont reçu l'haptène seul. Il semble bien que l'haptène, en se fixant sur l'anticorps correspondant, modifie la toxicité du complexe.

BIBLIOGRAPHIE

- APITZ (K.). — A study of the generalized Schwartzmann phenomenon. *Journ. of Immun.*, 1935, vol. 29, p. 355.
- ARMAND (Y.). — Spécificité sérologique et constitution chimique de quelques antigènes, 1 vol., Paris 1939, Hermann, éditeur.
- ARTHUS (M.). — Injections de sérum de cheval chez le lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, p. 817.
- ARTHUS (M.) et BRETON (M.). — Lésions cutanées produites par les injections de sérum de cheval chez le lapin anaphylactisé par et pour le sérum. *C. R. Soc. Biol.*, 1903, t. LV, p. 1478.
- AVERY (O. T.) et GOEBEL (W.). — Chemo-immunological studies on carbohydrate proteins. *Journ. of exper. Med.*, 1931, t. LIV, p. 437 ; 1933, t. LVIII, p. 731.
- BERGER (E.) et ERLÉNMEYER (H.). — Stoffliche Beziehungen zwischen Antigen und Antikörper. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1932, t. CXII, p. 79.
- Ueber immunchemische Untersuchungen in der Pyrazolon-Reihe. *Arch. Pathol. und Pharmacol.*, 1935, t. CLXXVII, p. 116.
- BESREDKA (A.). — Anaphylaxie et antianaphylaxie, 1 vol., Paris, 1917, Masson, édit.
- BOIVIN (A.) et MESROBEANU (L.). — Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. *Revue d'Immunologie*, 1935, t. I, p. 553-569 ; 1936, t. II, p. 113-144.
- BOIVIN (A.), MESROBEANU (L.) et (I.). — Préparation et propriétés biologiques d'une substance non protéidique à la fois toxique spécifique et immunisante existant dans les formes S. du b. d'Aertrycke et du B. de Gärtner et manquant dans les formes R. des mêmes bactéries. *Arch. roumaines de Pathol. exp. et microbiol.*, 1935, t. VIII, p. 45-86.

- BORDET (J.). — Immunité antigène, anticorps, in traité de Physiologie de ROGER et BINET, 1926, p. 428, 1 vol., Paris, Masson, édit.
- BOYD (W.) et HOOKER (S.). — Some analyses of azoproteins : casein, gelatin, and zein coupled with arsanilic acid. *Journ. of biol. Chem.*, 1934, t. CIV, p. 329.
- BRUSCHKIES. — Konstitution und Wirkung aromatischer Arsenverbindungen. *Zntrbl. f. Bakt., Paras. etc.*, I, Orig. 1937, vol. 140, p. 206.
- DOERR (R.). — Allergie und Anaphylaxie. In *Handbuch der pathogen. Mikroorganismen*. Kolle et Wassermann, 1929, III^e édit., t. , pp. 759-1008.
- DUJARRIC de la RIVIÈRE (R.) et KOSSOVITCHI (N.). — Globules rouges et Immunité. *Ann. Institut Pasteur*, 1933, t. LI, p. 149.
- Antigènes, hétéro-antigènes et haptènes, 1 vol., Paris, 1937, Baillière édit.
- Pouvoir antigénique spécifique de divers isomères d'une même substance. *Revue d'Immunologie*, 1937, t. III, n^o 5.
- DUJARRIC de la RIVIÈRE (R.), KOSSOVITCH (N.), M^{lle} ARMAND (Y.) et ADRA (Ch.). — Spécificité chimique et spécificité sérologique. Rapport présenté au X^e Congrès de chimie. Rome, mai 1938.
- FIERZ (H. E.), JADASSOHN (W.) et STOLL (W.). — Anaphylactic sensitization with chemically definite compounds. *Journ. of exper. Med.*, 1937, t. LXV, p. 339.
- Azofarbstoffe und Immunbiologie, Aufhebung anaphylaktischer Azoprotein-Ueberempfindlichkeit durch p-Phenyl-arsinsäure-azofarbstoffe. *Helvetica Chimica Acta*, 1937, t. XX, p. 1059.
- GRATIA (A.) et LINZ (R.). — Relations entre le phénomène d'Arthus et le phénomène de Schwartzmann. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1933, t. LI, p. 89.
- HALBAN (J.) et LANDSTEINER (K.). — Ueber Unterschiede des fötalen Blutserums und über eine agglutinations und fällungshemmende Wirkung des Normalserums. *Münch. med. Woch.*, 1902, n^o 12, p. 473.
- HAUROWITZ (F.). — Ueber die Bindung zwischen Antigen und

- präzipitierendem Antikörper. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1937, t. CCXLV, p. 23.
- HEIDELBERGER (M.). — Immunochemistry. *Annal. Review of Biochem. Standorf University Press*, 1932, t. I, pp. 655-674 ; 1933, t. II, pp. 503-520 ; 1935, t. IV, pp. 560-592.
- HOOKE (S. B.) et BOYD (W.). — The existence of antigenic determinants of diverse specificity in a single Protein I Tyrosine and Histidin diazo-arsanilic acids as Haptens. *Journ. of Immunol.*, 1933, t. XXV, p. 61 ; 1934, t. XXVI, p. 469 ; 1936, t. XXX, p. 41.
- KOSSOVITCH (N.) et ADRA (Ch.). — Spécificité sérologique des dérivés arsenicaux des groupes orsanine et stovarsol. *Revue d'Immunologie*, mai 1939, n° 3, p. 272.
- KOSSOVITCH (N.) et ARMAND (M^{lle} Y.). — Mise en évidence par des réactions biologiques de l'état allergique d'animaux sensibilisés avec divers composés chimiques. Rapport présenté au 1^{er} Congrès Intern. des microbiol. de langue française, oct. 1938, Paris.
- LANDSTEINER (K.). — Spezifische Serumreaktionen mit einfach zusammengesetzten Substanzen von bekannter Konstitution. *Biochem. Zeitschr.*, 1920, t. CIV, p. 280.
- Ueber die Bedeutung der Protein-Komponente bei den Pāzipitinreaktionen der Azoproteine. *Biochem. Zeitschr.*, 1919, t. XCIII, p. 106.
- The specificity of serological reactions ; 1 vol., London, 1936, Baillière, Tindal and Cox.
- LANDSTEINER (K.) et CHASE (M. W.). — Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. IV. Anaphylaxis induced by picrylchloride and 2-4 dinitrochlorobenzene. *Journ. of exper. Med.*, 1937, t. LXVI, p. 337.
- LANDSTEINER (K.) et JACOBS (J.). — Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journ. of exper. Med.*, 1935, t. LXI, pp. 643-656 ; 1936, t. LXVI, pp. 625-715.
- LANDSTEINER et LAMPL (H.). — Ueber die Antigeneigenschaften von Azoprotein. *Biochem. Zeitschr.*, 1918, t. LXXXVI, p. 343 ; *Zeitschr. Immunf.*, 1917, t. XXVI, p. 293.
- LANDSTEINER (K.) et LEVINE (P. A.). — Experiments on ana-

- phylaxis to azoproteins. *Journ. of exper. Med.*, 1930, t. LII, p. 347.
- LANDSTEINER (K.) et VAN DER SCHERR (J.). — Serological differentiation of steric isomers. *Journ. exper. Med.*, 1928, t. XLVIII, p. 315, 1929 ; t. L, p. 407.
- Anaphylactic shock by azodyes. *Journ. of exper. Med.*, I, 1933, t. LVII, p. 633, II, 1938, t. LXVII, p. 70.
- MACHEBŒUF (M. A.), LÉVY (G.), BONNEFOI (A.) et FAURE (M.). — Études sur les antigènes fixateurs des bacilles tuberculeux (3 mémoires). *Bull. Soc. chimie biol.*, 1935, t. XVII, pp. 1194-1234.
- MARRACK (J. R.). — The chemistry of antigens and antibodies, 1 vol., 1934. London, published by Majest. Stationary office.
- MARRACK (J. R.) et SMITH (F. C.). — Quantitative aspects of immunity reactions : the combination of antibodies with simple haptens. *Brit. Journ. of exper. Pathol.*, 1932, t. XIII, p. 394.
- MEYER (Kurt). — Sur des anticorps à affinités multiples. *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, t. LVI, p. 684.
- MORGAN (W. T. J.). — A conception of immunological spécificity. *Journ. of Hygiene*, 1937, t. XXXVII, p. 372.
- NITTI (F.) et BOVET (D.). — La coupure de certains azoïques dans l'organisme animal et les phénomènes allergiques provoqués par la sulfamido-chrysoïdine. *Bull. Soc. Ch. biol.*, 1937, t. XIX, p. 837.
- OBERMAYER (F.) et PICK (E. P.). — Ueber die Einwirkung von Salpetersäure auf Eiweisstoffe. *Wien. klin. Woch.*, 1906, t. XIX, pp. 327-331.
- PASTEUR-VALLÉRY-RADOT, MAURIC (G.) et M^{me} HOLTZER (ex-HUGO). — L'anaphylaxie expérimentale et humaine, 1 vol., 1937, Paris, Masson, édit.
- PAULY (H.). — Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweisses. *Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1915, t. XCIV, p. 284.
- PRAUSNITZ (C.) et KÜSTNER (H.). — Studien über die Ueberempfindlichkeit. *Centrbl. Bakt.*, I. Abt., Orig., 1921, t. LXXXVI, p. 160.
- RAMON (G.). — Sur le pouvoir flocculant et sur les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue atoxique (anatoxine). *C. R. Acad. Sciences*, 1923, t. CLXXVII, p. 13-38.

- ROSENTHAL (S. R.). — The conjugation of Haptens *in vivo*. *Journ. of Immun.*, 1938, t. XXXIV, p. 251.
- SACHS (H.). — Antigen und Antikörper. *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie*, 1929, vol. XIII.
- SANARELLI (G.). — Le choléra expérimental. *Ann. Institut Pasteur*, 1924, t. XXXVIII, p. 11.
- SANDOR (G.). — Le problème des protéïdes. *Thèse de Sciences*, 1934. Paris, Doin, édit.
- SHERWOOD (N. P.). — Immunology. 1 vol., 1935. London, Henry Kimpton, édit.
- TOPLEY (W. W. C.) et WILSON (G. S.). — The principles of Bacteriology and Immunity, 1 vol., 1937. London, Ed. Arnold, édit.
- TRÉFOUEL (J.) et M^{me} (J.), NITTI (F.) et BOVET (D.). — Activité du *p*-amino-phényl-sulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, t. CXXX, p. 736 ; *Ann. Institut Pasteur*, 1937, t. LVIII, p. 30.
- UHLENHUTH (P.). — Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten, im besonderen zum differentialdiagnostischen Nachweise des Menschenblutes. *Deutsche med. Woch.*, 1901, pp. 82-260.
- VELLIZ (L.). — Chimie et Immunité. Rapport présenté au VI^e Congrès de Chimie biologique, Lyon, oct. 1937, p. 173.
- WELLS (H. G.). — Chemicals aspects of Immunology, 1 vol., 1929, New York. The Chemical catalog. C^o.
- WORMALL (A.). — The immunological specificity of chemically altered proteins. *Journ. of exp. Med.*, 1930, t. LI, p. 295.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
Préparation des antigènes étudiés	11
CHAPITRE II	
a) Préparation des Immunsérums	25
b) Sensibilisation des animaux.....	26
CHAPITRE III	
Immunoréactions	28
<i>in vitro</i>	28
<i>in vivo</i>	31
CHAPITRE IV	
Résultats	36
CHAPITRE V	
Préparation des antigènes complexes dans lesquels le pro- téide est remplacé par l'histamine.....	56

CHAPITRE VI

Recherche de l'arsenic dans les sérums provenant des animaux immunisés par les substances arsenicales.....	59
CONCLUSIONS.....	60
BIBLIOGRAPHIE	65

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA VITAMINE B₁

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 6 février 1940.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

ROUSSY.

